

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Selected.
- To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

☒ Select All  
☒ Clear Selections

Print/Save Selected

Send Results

Display Selected

Format

Free

4/5/1 DIALOG(P)File 352-Derwent WPI (c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

009729334

WPI Acc No: 1994-009184/199402

XRAM Acc No: C94-003686

XRPX Acc No: N94-007420

New fructosyl-amine deglycase from Candida fermentation -  
 catalyses oxidn. of amadori cpds. to produce alpha-keto-aldehyde, amine  
 deriv. and hydrogen peroxide

Patent Assignee: NAKANO VINEGAR CO LTD (NAKA-N); NAKANO SUMISE KK (NAKA-N)

Inventor: ISHIKAWA A; KAWAMURA Y; OHSHIMA Y; OKUMURA H; YAMADA M

Number of Countries: 007 Number of Patents: 005

Patent Family:

| Patent No  | Kind | Date     | Applicat No | Kind | Date     | Week     |
|------------|------|----------|-------------|------|----------|----------|
| EP 576838  | A2   | 19940105 | EP 93108649 | A    | 19930528 | 199402 B |
| JP 6046846 | A    | 19940222 | JP 92279292 | A    | 19920925 | 199412   |
| US 5387109 | A    | 19950207 | US 9366499  | A    | 19930524 | 199512   |
| EP 576838  | A3   | 19940706 | EP 93108649 | A    | 19930528 | 199528   |
| JP 3157622 | B2   | 20010416 | JP 92279292 | A    | 19920925 | 200124   |

Priority Applications (No Type Date): JP 92279292 A 19920925; JP 92169938 A  
 19920605

Cited Patents: No-SR. Pub: 3. Jnl. Ref: JP 61280297

Patent Details:

| Patent No | Kind | Lan | Pg | Main IPC    | Filing Notes |
|-----------|------|-----|----|-------------|--------------|
| EP 576838 | A2   | E   | 19 | C12N-009/00 |              |

Designated States (Regional): DE FR GB IT NL

|            |   |    |             |
|------------|---|----|-------------|
| JP 6046846 | A | 13 | C12N-009/06 |
|------------|---|----|-------------|

|            |   |    |             |
|------------|---|----|-------------|
| US 5387109 | A | 14 | C12N-009/04 |
|------------|---|----|-------------|

|           |    |  |             |
|-----------|----|--|-------------|
| EP 576838 | A3 |  | C12N-009/00 |
|-----------|----|--|-------------|

|            |    |    |             |                                  |
|------------|----|----|-------------|----------------------------------|
| JP 3157622 | B2 | 13 | C12N-009/06 | Previous Publ. patent JP 6046846 |
|------------|----|----|-------------|----------------------------------|

Abstract (Basic): EP 576838 A

A fructosylamine deglycase (I) with the following physico-chemical properties is new. (a) effect and substrate specificity: (I) acts on amadori cpds., esp. effectively on its epsilon-aminoacid deriv. to catalyse oxidn. of teh cpds. to produce an alpha-keto aldehyde, and amine deriv. and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (b) optimum pH and pH stability: (I) is stable at pH 5.0 to 8.0 to a substrate of di-fructosyl-lysine and the optimum pH range of it to the substrate is 7.0-8.0 (in a phosphate buffer); (c) range of reaction temp.: 15-45 deg. C.; (d) thermostability: (I) is stable to heat treatment of 40 deg. C. for 10 mins., and when it is heated at 50 deg. C. for 10 mins., 80% or more of it is inactivated; (e) mol.wt.: 43000, as measured by gel filtration on Toyo Pearl HW-55F column.

Thus (I) may be used to determine the concn. of fructosylamine cpds., in food prods. of high aminoacid and saccharide content, such as soy sauce, and thus determine storage effects on the flavour of the food prod. (I) may also be used to determine levels of fructosamine (formed by reaction of albumin in serum with glucose) in blood as an index for diagnosis of diabetes. Use of (I) is advantageous in that determ. may be accurately performed even in the presence of contaminating substances and other prior art problems are also overcome, such as staining methods. Use of (I) to measure glycohaemoglobin is simpler and less time consuming than prior art methods. (I) is obtd. by fermentation of Cndida guilliermondii.

USE/ADVANTAGE - (I) may be used for quantitative determ. methods

based on the decomposition of fructosylamine cpds.

Dwg. 0/6

Title Terms: NEW; FRUCTOSYL; AMINE; CANDIDA; FERMENTATION; CATALYST;  
OXIDATION; AMADORI; COMPOUND; PRODUCE; ALPHA; KETO; ALDEHYDE; AMINE;  
DERIVATIVE; HYDROGEN; PEROXIDE

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Main): C12N-009/00; C12N-009/04; C12N-009/06

International Patent Class (Additional): C12N-009/08; C12Q-001/26;

G01N-033/50; C12N-009/06; C12R-001-72

File Segment: CPI; EPI

Derwent WPI (Dialog® File 352): (c) 2005 Thomson Derwent. All rights reserved.

|  |   |                     |              |                  |   |
|--|---|---------------------|--------------|------------------|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Select All | <input type="checkbox"/> Clear Selections | Print/Save Selected | Send Results | Display Selected | Format  |
|  |   |                     |              | Free             |  |

© 2005 Dialog, a Thomson business

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-46846

(43)公開日 平成6年(1994)2月22日

| (51)Int.Cl. <sup>3</sup> | 識別記号 | 国内整理番号  | F I | 技術表示箇所 |
|--------------------------|------|---------|-----|--------|
| C 1 2 N 9/06             | Z    | 9359-4B |     |        |
| C 1 2 Q 1/26             |      | 6807-4B |     |        |
| // (C 1 2 N 9/06         |      |         |     |        |
| C 1 2 R 1:72)            |      |         |     |        |

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全 13 頁)

(21)出願番号 特願平4-279292

(22)出願日 平成4年(1992)9月25日

(31)優先権主張番号 特願平4-169938

(32)優先日 平4(1992)6月5日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 390022644

株式会社中埜酢店

愛知県半田市市中村町2丁目6番地

(72)発明者 石川 篤志

愛知県半田市有脇町10丁目68番地

(72)発明者 大島 芳文

愛知県半田市荒古町2丁目11番地

(72)発明者 山田 巳喜男

愛知県半田市花園町6丁目20番地の22

(72)発明者 奥村 一

愛知県半田市岩滑東町5丁目66番地の14

(72)発明者 川村 吉也

愛知県江南市古知野町古渡132

(74)代理人 弁理士 久保田 藤郎

(54)【発明の名称】 フルクトシルアミンデグリカーゼ、その製造法及び該酵素を用いたアマドリ化合物の定量方法

(57)【要約】 (修正有)

【構成】 アマドリ化合物に作用し、該化合物を酸化して $\alpha$ -ケトアルデヒド、アミン誘導体及び過酸化水素を生成する反応を触媒する等の理化学的性質を有するフルクトシルアミンデグリカーゼ、カンジダ属に属し該酵素を生産する能力を有する微生物たとえばカンジタ・ギアモンディを用いて該酵素を製造する方法並びにアマドリ化合物を含有する試料に該新規酵素を作用させ、酸化反応に伴い生成する過酸化水素量、もしくは消費される酸素量を測定し、該測定値からアマドリ化合物量を求めることを特徴とするアマドリ化合物の定量法。

【効果】 酵素法で困難であったアマドリ化合物量の測定を容易に行うことができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の理化学的性質を有するフルクトシルアミンデグリカーゼ。

## (a) 作用及び基質特異性

本酵素は、アマドリ化合物に作用し、特にそのε-アミノ酸誘導体に良好に作用して該化合物を酸化し、α-ケトアルデヒド、アミン誘導体及び過酸化水素を生成する反応を触媒する。

## (b) 至適pH及びpH安定性

本酵素は、ジフルクトシルリジン(di-Fructosyl-lysine)を基質とした場合にpH5.0~8.0において安定であり、また至適pHは、7.0~8.0(燐緩衝液)である。

## (c) 反応温度の範囲

反応温度は、15~45℃の範囲である。

## (d) 熱安定性

本酵素は、40℃、10分間の加熱処理に対して安定である。また、50℃で10分間加熱処理した場合、80%以上が失活する。

## (e) 分子量

トーヨーパール HW-55Fカラムを用いたゲル濾過法で測定した分子量は約43000である。

【請求項2】 カンジダ属に属し請求項1記載のフルクトシルアミンデグリカーゼ生産能を有する微生物を培地に培養し、培養物より該フルクトシルアミンデグリカーゼを採取することを特徴とするフルクトシルアミンデグリカーゼの製造法。

【請求項3】 カンジダ属に属し請求項1記載のフルクトシルアミンデグリカーゼ生産能を有する微生物がカンジダ・ギアモンディ(Candida guilliermondii)である請求項2記載の製造法。

【請求項4】 アマドリ化合物を含有する試料に請求項1記載のフルクトシルアミンデグリカーゼを作用させ、酸化反応に伴い生成する過酸化水素量、もしくは消費される酸素量を測定し、該測定値からアマドリ化合物量を求めることを特徴とするアマドリ化合物の定量方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規酵素フルクトシルアミンデグリカーゼとその製造法及び該酵素を使用する試料中のアマドリ化合物の定量方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】本発明でいうアマドリ化合物とは、還元糖であるアルドースとアミノ基をもった化合物とが非酵素的に反応し、アマドリ転移を経て形成される化合物をいう。例えば、醤油、味噌等の、糖とアミノ酸、タンパク質を多量に含んだ物質では、発酵時間、保存時間等に応じてアミノ酸は糖化されてアマドリ化合物として生産され、食品の褐変や香気成分の変化に重要な役割を示すことが知られている。

生体中においてもグルコースとアミノ基が結合したアマドリ化合物であるフルクトシルアミン化合物が生成されており、例えば血液中のヘモグロビンがグルコース糖化されたフルクトシルアミン化合物はグリコヘモグロビン、また血清中に存在するアルブミンがグルコースと反応して生成したフルクトシルアミン化合物はフルクトサミンと呼ばれ、それぞれ臨床的に糖尿病の血糖値を示す指標として生理的意義が指示され、糖尿病診断のために盛んに測定されている。

【0003】グリコヘモグロビンについては高速液体クロマトグラフィーを利用した測定方法(Chromatogr. Sci., 第10巻, 659(1979))があるが、操作能率や精度の点で問題があり、また高価な機器を必要とするなどの欠点が多い。また、フルクトサミン測定方法として近年広く用いられているフルクトシルアミン化合物がアルカリ性条件下において示す還元性を利用して色素発色により測定する方法(Clin. Chem. Acta., 第127巻, 87(1983))があるが、その反応の特異性に問題があり、また色素が測定中にセルを汚染するといった問題もある。そのため、新しい測定方法が求められている。

【0004】従来のアマドリ化合物分解酵素としては、コリネバクテリウム属に属する微生物が生産するフルクトシルアミノ酸オキシターゼ(特開昭61-268178)、アスペルギルス属に属する微生物が生産するフルクトシルアミノ酸オキシターゼ(特開平3-155780)、さらにはペニシリウム属に属する微生物が生産するフルクトシルアミノ酸分解酵素(特開平4-4874)等が知られている。しかし、食品や生体中のフルクトシルアミン化合物を定量するためには、アミノ酸のα位のアミノ基と反応して生成するアマドリ化合物に対してのみならず、特にε位のアミノ基と反応し生成するアマドリ化合物に対して極めて良く作用する酵素が重要である。しかるに、既知の酵素では反応性が弱く、微量のアマドリ化合物を定量することは困難であった。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、これらアマドリ化合物を酵素を用いて定量する方法を開発すべく、鋭意検討してきた。本発明者等は、広く自然界微生物中に、アマドリ化合物を分解する活性のある酵素を検索した結果、カンジダ属に属する微生物中にアミノ酸のα位のみならず、特にε位のアミノ基と反応し生成したアマドリ化合物に対しても極めて良く作用する酵素を生産する菌株があることを見出し、この知見に基づいて本発明を完成させた。以下に本発明を具体的に説明する。

【0006】本発明は、第1に下記の理化学的性質を有するフルクトシルアミンデグリカーゼに関する。

## (a) 作用及び基質特異性

本酵素は、アマドリ化合物に作用し、特にそのε-アミノ酸誘導体に良好に作用して該化合物を酸化し、α-ケトアルデヒド、アミン誘導体及び過酸化水素を生成する

反応を触媒する。

(b) 至適pH及びpH安定性

本酵素は、ジフルクトシルリジン(di-Fructosyl-lysine)を基質とした場合にpH5.0~8.0において安定であり、また至適pHは、7.0~8.0(磷酸緩衝液)である。

(c) 反応温度の範囲

反応温度は、15~45℃の範囲である。

(d) 熱安定性

本酵素は、40℃、10分間の加熱処理に対して安定である。また、50℃で10分間加熱処理した場合、80%以上が失活する。

(e) 分子量

トーヨーパール HW-55Fカラムを用いたゲル濾過法で測定した分子量は約43000である。

【0007】第2は、カンジダ属に属し請求項1記載のフルクトシルアミンデグリカーゼ生産能を有する微生物を培地に培養し、培養物より該フルクトシルアミンデグリカーゼを採取することを特徴とするフルクトシルアミンデグリカーゼの製造法に関する。

【0008】さらに、本発明は第3に、アマドリ化合物を含有する試料に前記のフルクトシルアミンデグリカーゼを作用させ、酸化反応に伴い生成する過酸化水素量、もしくは消費される酵素量を測定し、該測定値からアマドリ化合物量を求めることを特徴とするアマドリ化合物の定量法に関する。

【0009】本発明のフルクトシルアミンデグリカーゼの理化学的性質は下記の通りである。

(1) 力価の測定方法

本酵素作用によって生成する過酸化水素水を発色定量する方法

方法1

0.3mM 4-アミノアンチピリン及び0.5mM T O O S、2.0単位/mlのパーオキシダーゼを含有する0.05M磷酸緩衝液(pH7.0)0.4mlに1mM ジフルクトシルリジン(0.05M磷酸緩衝液pH7.0に溶解)0.1mlを加え、37℃にて温度平衡にする。これに、適当な活性を保有する酵素液0.06mlを加え、分光光度計(日立製作所製U-2000)により、その吸光値変化を測定した。予め過酸化水素の標準溶液を用いて作成した吸光値変化と過酸化水素の量との関係を示す検量線から、生成した過酸化水素量を求めた。また、37℃、1分間当たり1マイクロモルの過酸化水素を生成する酵素量を1活性単位とした。

【0010】方法2

1mM ジフルクトシルリジン(0.05M磷酸緩衝液pH7.0に溶解)0.2mlを37℃にて温度平衡にする。これに、適当な活性を保有する酵素液0.12mlを加え、37℃にて適当な時間反応させ100℃湯浴中で反応を停止させる。これに0.3mM 4-アミノアンチピリン及び0.5mM T O O S、2.0単位/mlのパーオキシダーゼを含有する0.05M磷酸緩衝液(pH7.0)0.8mlを加え、分光光度計(日立製作所製U-2000)により、その吸光値変化を測定した。標準液を用いて作成した該吸光値変化と過酸化水素の量との関係を示す検量線から、生成した過酸化水素量を求めた。また、37℃、1分間当たり1マイクロモルの過酸化水素を生成する酵素量を1活性単位とした。

【0011】(2) 作用および基質特異性

本酵素は、 $\alpha$ -アミノ酸、 $\beta$ -アミノ酸、 $\epsilon$ -アミノ酸、D-アミノ酸及びアミンのアマドリ化合物を分解し、グルコソシ、過酸化水素水及び対応するアミノ酸やアミンを生成する反応を触媒する。本酵素の主なアマドリ化合物への基質特異性は第1表に示した通りである。本酵素は $\alpha$ -アミノ酸のアマドリ化合物を分解するだけでなく、アミノ酸の $\alpha$ 位以外のアミノ基にフルクトースの結合したアマドリ化合物(例えば、ジ-D-フルクトシルリジン、 $\epsilon$ -D-フルクトシル-L-リジン)に対しても良好に作用する。

【0012】従来知られているフルクトシルアミン化合物分解酵素であるコリネバクテリウム属に属する微生物が生産するフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ(特開昭61-268178)は、 $\epsilon$ 位のアマドリ化合物には作用しない。また、アスペルギルス属に属する微生物が生産するフルクトシルアミノオキシダーゼ(特開平3-155780)は、 $\epsilon$ 位のアマドリ化合物に作用すると明細書に記載されているが、 $\alpha$ 位のD-フルクトシルグリシンに比べ、その活性は低い。同様に、ペニシリウム属に属する微生物が生産するフルクトシルアミノ酸分解酵素(特開平4-4874)も本願発明の酵素に比較して著しく活性が低い。

【0013】しかるに、本願発明の酵素はアミノ酸の $\alpha$ 位以外のアミノ基にフルクトースの結合したアマドリ化合物(例えば、ジ-D-フルクトシルリジン、 $\epsilon$ -D-フルクトシル-L-リジン)に対しても良好に作用するという特性を有している。なお、測定に用いた基質濃度は2mMである(但し、ジ-D-フルクトシルリジンのみは1mMである。)

【0014】

【表1】

10

20

30

40

第1表 酵素の基質特異性

| 基 質                 | 活 性  |
|---------------------|------|
| D-フルクトシルグリシン        | 100  |
| D-フルクトシル-L-アラニン     | 251  |
| D-フルクトシル-D-アラニン     | 26   |
| D-フルクトシル-β-アラニン     | 44   |
| D-フルクトシル-L-フェニルアラニン | 36   |
| D-フルクトシル-L-プロリン     | 1348 |
| di-D-フルクトシルリジン      | 3500 |
| ε-D-フルクトシル-L-リジン    | 1386 |
| D-フルクトシル-ポリリジン      | 34   |
| D-フルクトシル-メチルアミン     | 105  |
| D-フルクトシル-サルコシン      | 63   |

数値はそれぞれD-フルクトシルグリシンに対する活性を100とした場合の

比である。

【0015】表中の数値はそれぞれD-フルクトシルグリシンに対する活性を100とした場合の比である。

【0016】(3) 至適pH

本酵素(0.2単位)を各緩衝液中にて37℃で4分間反応させ、生成した過酸化水素を比色定量し、その活性を調べた。その結果、本酵素の至適pHはジフルクトシルリジンを基質とした場合、図1に示すように、pH7.0~8.0である。なお、使用した緩衝液は下記の通りであり、pH7.0における活性を100%として示した。

○-○ 0.1M クエン酸緩衝液  
 +-+ 0.1M 磷酸緩衝液  
 △-△ 0.1M トリス塩酸緩衝液

【0017】(4) pH安定性

本酵素(0.2単位)を含有する各緩衝液を37℃で10分間加熱処理したのち37℃で反応させ、吸光値変化より活性を調べた。その結果は図2に示した通りである。なお、使用した緩衝液は下記の通りであり、pH7.0処理における活性を100%として示した。

○-○ 0.1M クエン酸緩衝液  
 +-+ 0.1M 磷酸緩衝液  
 △-△ 0.1M トリス塩酸緩衝液

【0018】(5) 反応温度の範囲

ジフルクトシルリジンを基質とした場合、本酵素(0.3単位)により10mM磷酸緩衝液(pH6.0)中で、各温度において4分間反応させ、生成した過酸化水素を

比色定量した。その結果は、図3に示した通りであり、本酵素の反応適温は15~45℃である。なお、40℃における活性を100%として示した。

【0019】(6) 熱安定性

本酵素(0.2単位)を含有する酵素液0.2ml(10mM磷酸緩衝液、pH6.0)を各温度において10分間放置した。その後、この酵素液0.06mlを用いて37℃にて反応させ、吸光値変化より活性を調べた。ジフルクトシルリジンを基質とした場合の結果は、図4に示す通りであり、本酵素は40℃以下では安定であるが、50℃で80%以上が活性を失う。なお、図中には4℃処理における活性を100%として示した。

【0020】(7) 阻害剤の影響

本酵素0.2単位を含有する酵素液0.2ml(10mM磷酸緩衝液、pH6.0)に阻害剤を混合し、37℃において4分間反応させ、生成した過酸化水素を比色定量した。2mMの阻害剤が本酵素に及ぼす影響は次の通りである。本酵素はCu<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>により強く阻害され、Mg<sup>2+</sup>には阻害されなかった。また、p-クロルメルクリ安息香酸(PCMB)には強く阻害され、NaN<sub>3</sub>には阻害されなかった。

【0021】(8) 精製方法

本酵素は後記する精製方法により精製することができる。

【0022】(9) 分子量

本酵素の分子量は、トーヨーパール HW-55Fを用いたゲル濾過法により測定した結果、約43000であった。なお、測定に用いた緩衝液は0.1M塩化ナトリウムを含有する10mM磷酸緩衝液(pH6.0)である。

#### 【0023】(10) 等電点

ディスク等電点電気泳動法により測定した結果、本酵素の等電点はpI=4.8であった。

#### 【0024】(11) 酵素純度の検定

電気泳動用グラジエントゲル(PAG4/15、第一化学製品株式会社製)を用いて30mA/ゲルで2時間泳動を行い、酵素タンパク質をクマシーブリリアントブルーG-250で染色した。その結果、単一なバンドを確認した。

【0025】本酵素は、前記のように、その作用及び基質特異性において従来未知の新規な酵素である。なお、本酵素は上記のような作用及び基質特異性を有しているため、フラクトシルアミンデグリカーゼと命名した。

【0026】次に、本発明によるフラクトシルアミンデグリカーゼの製造方法について説明する。本発明において用いる微生物はフラクトシルアミンデグリカーゼ生産能を有する微生物であればいずれでも良いが、具体例としてカンジダ・ギアモンドイ(Candida guilliermondii) 7087が挙げられる。また、本菌の自然もしくは人工的な変異処理により得られる菌株も、上記能力を有する限り本発明に用いることができる。

【0027】本菌株は、本発明者らが三重県山中のクヌ

ギの樹液より分離した菌株であり、その菌学的性質は下記の通りである。

#### (1) MY培地(25℃生育)

生育は普通で4日間プレート培養した結果、乳白色、平滑で粘ちよう感のある全縁がやや波状の、凸状のコロニーが得られた。

(2) 細胞の形態は、伸長形、円筒形、ソーセージ形であり、多極出芽で増殖し、小さな楕円形細胞が混在していた。

(3) オイル状の沈査しやすい膜を形成した。

(4) グルコースよりガスを生成した。

(5) 硝酸塩の資化性は認められなかった。

(6) アピCオクサノグラム(アスカ純薬株式会社製)により炭水化物資化性を調べた。その結果を第2表に示す

【0028】また、上記の菌学的性質を“The Yeast, A Taxonomic”(M.J.W.Kreger-van Rij(ed)、Elsevier Science Publishers B.V.-Amsterdam(1984))を参考にして検討した結果、カンジダ・ギアモンドイ(Candida guilliermondii)と同定し、本菌をカンジダ・ギアモンドイ7087株と命名した。

【0029】なお、本菌は工業技術院微生物工業技術研究所にFERM BP-3878として寄託されている。

#### 【0030】

【表2】

第2表 炭水化物の質化性

| 基 質             | 活 性 |
|-----------------|-----|
| グルコース           | +++ |
| グリセロール          | +++ |
| 2-ケトジフルコン酸      | +++ |
| L-アラビノース        | +++ |
| キシロース           | +++ |
| アドニトール          | +++ |
| キシリトール          | +++ |
| ガラクトース          | +++ |
| イノシトール          | -   |
| ソルビトール          | +++ |
| メチル-D-グルコシド     | +++ |
| N-アセチル-D-グルコサミン | +++ |
| セロビオース          | +++ |
| ラクトース           | -   |
| マルトース           | +++ |
| サッカロース          | +++ |
| トレハロース          | +++ |
| メレジトース          | +++ |
| ラフィノース          | +++ |

+++ : 質化性あり

- : 質化性なし

【0031】+++ : 質化性あり

- : 質化性なし

【0032】本発明の酵素を生産するために使用する培地としては、炭素源、窒素源、無機物、その他の栄養素を適当に含有しており、上記微生物を培養して目的とする酵素を生産し得るものであれば、合成培地、天然培地のいずれであつてもよい。炭素源としては、例えばグルコース、フルクトース、ショ糖等の糖類の他、これらを含む天然物を用いることができる。窒素源としては無機アンモニア塩の他、ペプトン、カゼイン消化物、酵母エキス等の窒素性有機物を使用することができる。また、無機物としては、マグネシウム、ナトリウム、カリウム、マンガン、鉄等の塩類が使用できる。

【0033】本発明の酵素、フルクトシルアミンデグリカーゼを効率よく生産するためには、フルクトシルアミノ酸を培地に添加して培養する方法が好ましい。例えばフルクトシルリジン1%、燐酸2カリウム0.1%、硫酸マグネシウム0.05%、塩化カリウム0.05%、硫酸鉄(II)0.001%、グルコース1.0%、イーストエキス0.05%を含有した培地(pH6.8)が好適な培地として挙げられる。

30 【0034】培養温度は通常25~35℃の範囲が適当であり、好ましくは30℃付近である。培養時のpHは4.0~7.0が適当であるが、pH5.0付近が望ましい。また、培養時間は目的とする酵素が十分に生産されるまでであり、通常は12~36時間が適当である。培養方法としては、振盪培養または深部攪拌培養が望ましい。

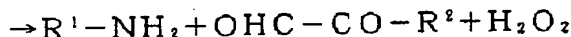
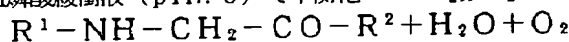
40 【0035】次に、精製方法について述べると、本酵素は通常菌体内に存在するので、培養物から菌体を集め、適当量の緩衝液に懸濁し菌体を破碎し、酵素を可溶化することにより酵素含有液を得ることができる。このようにして得られた酵素含有液から核酸、細胞壁等の夾雑物を取り除いてフルクトシルアミンデグリカーゼを得ることができる。

50 【0036】さらに、常法の酵素精製法を適用して本酵素を単離、精製することが可能である。例えば(1)硫酸分画、(2)DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー、(3)フェニルセルロースカラムクロマトグラフィー、(4)ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー、(5)ゲル濾過カラムクロマトグラフィー等の方法を単独で、または適宜組合わせたり、その他の方法を必要に応じて組合わせ用いることにより、本酵素



の精製品を得ることができる。

【0037】本酵素の精製法の具体例は次の通りである。培養物中から集めた菌体を5mM EDTAを含有する50mM磷酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、フレンチプレス(アメリカンインストルメントカンパニー製)による菌体破砕処理(1500psi)を行う。これを遠心分離して上清を集め、この上清液に硫酸アンモニウムを加え70%飽和濃度とし硫酸分画を行い、遠心分離して沈殿部分を集める。この沈殿部分を少量の1mM EDTAを含有する10mM磷酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、同緩衝液にて一夜透析をする。予め1mM EDTAを含有する10mM磷酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したDEAE-セルロフアインカラムにかけ酵素を吸着させる。1mM EDTAを含有する10mM磷酸緩衝液(pH7.0)で洗浄した後、0→0.1M塩化カリウム濃度勾配による溶出を行い活性部分を集める。得られた酵素液に硫酸アンモニウムを加え1.2Mに調整し、予め1.2M硫酸アンモニウム、1mM EDTAを含有する10mM磷酸緩衝液(pH7.0)で平衡化



【0040】上式において、 $R^1$ はタンパク質、ペプチド鎖、アミノ酸またはアミン残基を示し、 $R^2$ はアルドース残基を示す。

【0041】本発明の定量方法は、上記のようなフラクトシルアミン化合物含有する液であれば如何なるものでも適用することができる。例えば、醤油等の高濃度のアミノ酸、糖を含有する食品中のフラクトシルアミン化合物の濃度を定量することができる。生体中のフルクトサミンのような糖化タンパク質についても被検体を適当な処理によりフラクトシルアミノ酸を遊離させることにより測定可能である。

【0042】本発明の定量方法に使用する酵素は、菌体を破壊して該酵素を可溶化した粗酵素から各段階の精製酵素までフラクトシルアミン化合物を分解する活性を有するものであればよい。

【0043】本酵素を被検体に作用させる場合、pH6.0~9.0、40℃以下、好ましくはpH6.5~8.0、温度30~40℃で通常5分程度反応させる。この場合に用いる緩衝液としては、本酵素を阻害しないあらゆる緩衝液が使用可能であり、例えば酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液、クエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液、燐酸カリウム緩衝液、トリス塩酸緩衝液等が挙げられる。

【0044】本発明においては、下記のいずれかの方法によりアマドリ化合物を定量することが可能である。

(1) 酵素反応により生成する過酸化水素を測定する方法

本酵素の反応により生成する過酸化水素を常法の比色定量方法、過酸化水素電極法等を用いて測定することによ

させたフェニルセルロースカラムにかけ酵素を吸着させる。同緩衝液にて洗浄した後、1.2→0.5M硫酸アンモニウム濃度勾配による溶出を行い活性部分を集める。次に、得られた酵素液を1mM EDTAを含有する10mM磷酸緩衝液(pH6.0)により一夜透析を行う。この酵素液を同緩衝液で予め平衡化したヒドロキシアパタイトカラムにかけ、酵素を吸着させる。同緩衝液で洗浄した後、10→200mM同緩衝液濃度勾配により溶出を行い活性部分を集める。活性部分を濃縮後、予め0.1M塩化ナトリウムを含有する10mM磷酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したトーヨーパールHW-55Fカラムによりゲル濾過を行い、目的とする精製酵素を得ることができる。

【0038】次に、本発明によるアマドリ化合物の定量方法について説明する。本発明の定量方法は、次式に示すように、フラクトシルアミン化合物を酵素により分解することによるものである。

【0039】

【数1】

り過酸化水素濃度を定量する。次いで、予め用意した過酸化水素量とアマドリ化合物との標準曲線によりアマドリ化合物を定量する。なお、発色法によりアマドリ化合物を定量する場合、前記した「力価の測定方法」に記載した測定方法が一例として挙げられる。生体中のタンパク質の糖化量を測定する場合は、予めプロテアーゼにより糖結合部位であるアミノ酸残基を遊離させた後に本酵素を作用させ、同様にして測定することができる。

【0045】(2) 酸素消費に基づく定量方法  
本酵素の反応により消費される酸素量を測定し、予め用意した酸素消費量とアマドリ化合物との標準曲線によりアマドリ化合物を定量する。なお、酸素量の測定はワールブルグ検圧法、酸素電極法等の常法により測定できる。

【0046】

【実施例】次に、本発明を実施例により詳しく説明する。

実施例1

カンジダ・ギアモンディ(Candida guilliermondii)7087(FERM BP-3878)株をジフルクトシルリジン1%、燐酸2カリウム0.1%、硫酸マグネシウム0.05%、塩化カリウム0.05%、硫酸鉄(II)0.001%、グルコース1.0%およびイーストエキス0.05%を含有する培地(pH6.8)100mlを入れた坂口フラスコ(500ml容量)に植菌し、30℃で24時間振盪培養を行った。

【0047】次に、この種培養物を5リットルのジャーファーマンター中の上記組成と同一の培地3リットルに

植え、通気量2.5リットル/分、攪拌速度400r.p.mで温度を30℃、pHを5.0に制御し、24時間深部攪拌培養を実施した。培養終了後、培養液を6000r.p.m、4℃にて10分間遠心分離して集菌した。得られた培養菌体を5mM EDTAを含有する50mM燐酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、フレンチプレス(アメリカンインストルメントカンパニー製)による菌体破碎処理(1500psi)を行った。破碎液を12000r.p.m、4℃にて10分間遠心分離して上清部分を集め、280mlの上清液を得た。この上清液に硫酸アンモニウムを加え70%飽和濃度とし、4℃にて2時間放置した後、12000r.p.m、4℃にて10分間遠心分離して沈殿部分を集めた。

【0048】この沈殿部分を少量の1mM EDTAを含有する10mM燐酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、同緩衝液にて一夜透析をした。この酵素液を同緩衝液で予め平衡化したDEAE-セルロフアインカラム(直径5cm×10cm)にかけ、酵素を吸着させた。しかるのち、0→0.1M塩化カリウム濃度勾配による溶出を行い、活性部分を集めた。次に、この酵素液に硫酸アンモニウムを加え1.2Mに調整し、予め1.2M硫酸アンモニウムと1mM EDTAを含有する10mM燐酸緩衝液(pH7.0)で平衡化させたフェニルセファロースカラム(直径5cm×5cm)にかけ、酵素を吸着させた。さらに、1.2→0.5M硫酸アンモニウム濃度勾配による溶出を行い、活性部分を集めた。次に、この酵素液を1mM EDTAを含有する10mM燐酸緩衝液(pH6.0)により一夜透析を行った。この酵素液を同緩衝液で予め平衡化したヒドロキシアパタイトカラム(直径5cm×5cm)にかけ、酵素を吸着させた。10→200mM同緩衝液濃度勾配により溶出を行い、活性部分を集めた。

【0049】このようにして得た活性部分をアミコン社製限外濾過膜装置(分画膜10000)にて濃縮した後、予め0.1M塩化ナトリウムを含有する10mM燐酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したトヨパールHW-55Fカラム(直径2cm×70cm)にかけ、ゲル濾過を行った。この活性部分を集めた結果、50.4単位の酵素液が得られた。収率は12.2%であった。

#### 【0050】実施例2

グルコース15%、リジン5%を含む水溶液(pH6.8)20mlを121℃で15分間加圧処理し、燐酸2カリウム0.125%、硫酸マグネシウム0.063%、塩化カリウム0.063%、硫酸鉄(II)0.0013%、イーストエキス0.063%を含有する培地(pH6.8)80mlを入れた坂口プラスコ(500ml容量)に加え、カンジダ・ギアモンディ(*Candida guilliermondii*)7087(FERM BP-3878)株を植菌し、30℃で24時間振盪培養を行った。

【0051】次に、この種培養物を5リットルのジャー

ファーメンター中の上記組成と同一の培地3リットルに植え、通気量2.5リットル/分、攪拌速度400r.p.mで温度を30℃、pHを5.0に制御し、24時間深部攪拌培養を実施した。培養終了後、培養液を6000r.p.m、4℃にて10分間遠心分離して集菌した。得られた培養菌体を5mM EDTAを含有する50mM燐酸緩衝液(pH6.0)に懸濁し、グイノミル(シバツルエンタープライズ製)による菌体破碎処理(コンテナ容量0.6リットル、ビーズ直径0.25~0.5mm、流速10リットル/時間)を行った。破碎液を12000r.p.m、4℃にて10分間遠心分離して上清部分を集め、1400mlの上清液を得た。この上清液に硫酸アンモニウムを加え30%飽和濃度とし、4℃にて2時間放置した後、12000r.p.m、4℃にて10分間遠心分離して上清部分を集めた。

【0052】この上清部分に硫酸アンモニウムを加えて70%飽和濃度としたのち、4℃にて2時間放置した後、上記と同一条件で遠心分離して沈殿部分を得た。この沈殿部分を少量の1mM EDTAを含有する10mM燐酸緩衝液(pH6.0)に懸濁し、同緩衝液にて一夜透析をした。この酵素液を同緩衝液で予め平衡化したDEAE-セルロフアインカラム(直径5cm×10cm)にかけ、夾雑タンパク質を吸着させ、活性画分を含む非吸着部分を集めた。

【0053】次に、この酵素液を1mM EDTAを含有する10mM燐酸緩衝液(pH6.0)で予め平衡化したヒドロキシアパタイトカラム(直径5cm×5cm)にかけ、酵素を吸着させた。10→200mM同緩衝液濃度勾配により溶出を行い、活性部分を集めた。

【0054】このようにして得た活性部分をアミコン社製限外濾過膜装置(分画膜10000)にて濃縮した後、予め0.1M塩化ナトリウムを含有する10mM燐酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したトヨパールHW-55Fカラム(直径2cm×70cm)にかけ、ゲル濾過を行った。この活性部分を集めた結果、153単位の酵素液が得られた。収率は27.6%であった。

#### 【0055】実施例3

0.025~1.0mM ジフルクトシルリジン(50mM燐酸緩衝液、pH7.0に溶解したもの)0.1mlに0.3mM 4-アミノアンチピリン及び0.5mM TOOS, 2.0単位/mlのパーオキシダーゼを含有する0.05M燐酸緩衝液(pH7.0)0.4mlを加え、37℃にて温度平衡にした。

【0056】次いで、このものに0.2単位/mlの活性を保有する本酵素液0.06mlを加え、分光光度計(日立製作所製、U-2000)により555nmにおける2分間の吸光度変化を20秒毎に測定し、1分間当たりの吸光度変化を求めた。その結果、ジフルクトシルリジンの濃度と吸光度との間に図5のような比例関係を認め、このことからアマドリ化合物の定量が可能であるこ

10

20

30

40

50

とが確認された。

#### 【0057】実施例4

以下の方法により血清中タンパク質の糖化量を測定した。

##### (1) 血清タンパク質の分解

前処理試薬

プロナーゼ (和光純薬社製) 10,000uを10mM 炭酸緩衝液 (pH7.0) 1Lに溶解し反応液 (1) とした。

##### 【0058】(2) 発色測定試薬

0.3mM 4-アミノアンチピリン (和光純薬社製)、0.3mM TOOS (ドータイト社製)、2u/ml パーオキシダーゼ (片山化学社製) を50mM 炭酸緩衝液 (pH7.0) に溶解した溶液に、最終1u/mlになるように本フルクトシルアミンデグリカーゼを添加し、反応液 (2) とした。

##### 【0059】(3) 測定方法

10 $\mu$ lのヒト血清試料に反応液 (1) を200 $\mu$ l添加し攪拌後、37℃で5分間保温した。引き続いて反応液 (2) を200 $\mu$ l添加し攪拌後、37℃で保温しながら1分後および5分後の545nmにおける吸光度を分光光度計 (日立製作所製、U-2000型) で測定し、その吸光度変化を各検体の測定値とした。上記の方法により、糖尿病患者から健常者まで100件のヒト血清検体を測定した。なお、これらの血清試料は予めフラクトサミン法 (フラクトサミン測定キット「NEW グリカ・ピー」：中外製薬社製) により糖化量を測定した。

【0060】図6に結果を示したが、本発明の酵素を使用した酵素測定法は、化学的測定法 (フラクトサミン法) と高い相関性があることが示された。このように、プロテアーゼにより適当なタンパク質分解処理を施すこ

とによって生体中のタンパク質の糖化量を測定できることが確認された。

#### 【0061】

【発明の効果】本発明により、特に $\epsilon$ 位のアミノ基に糖が結合しているアマドリ化合物への反応性が高い特性を有する新規酵素とその製造法およびアマドリ化合物の定量方法が提供され、従来酵素法では困難であったアマドリ化合物量の測定を容易に行うことができるようになった。

10 【0062】特に生体中で重要な糖尿病の指標物質である糖化タンパク質を測定する場合、フラクトサミンの測定において本酵素法は、従来の化学的方法では避けられなかった生体試料中に混入する干渉物質の影響を受けにくく、より正確に測定することができ、さらに測定機器を汚染することもない。また、グリコヘモグロビンの測定においては、従来法に比べ操作が簡便で手間がかからず、短時間で測定することができるという特色を有している。

#### 【図面の簡単な説明】

20 【図1】 本発明の酵素のpHと相対活性の関係から至適pHを示すグラフ。

【図2】 本発明の酵素のpHと相対活性の関係からpH安定性を示すグラフ。

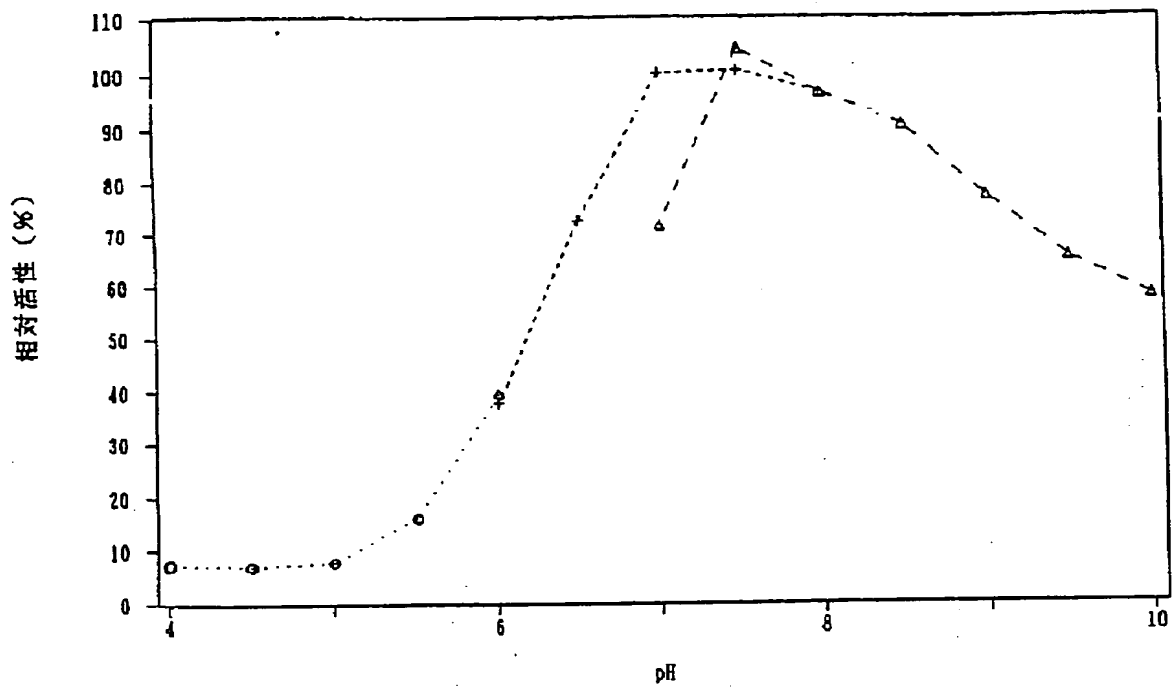
【図3】 本発明の酵素の温度と相対活性の関係から作用温度を示すグラフ。

【図4】 本発明の酵素の温度と相対活性の関係から温度安定性を示すグラフ。

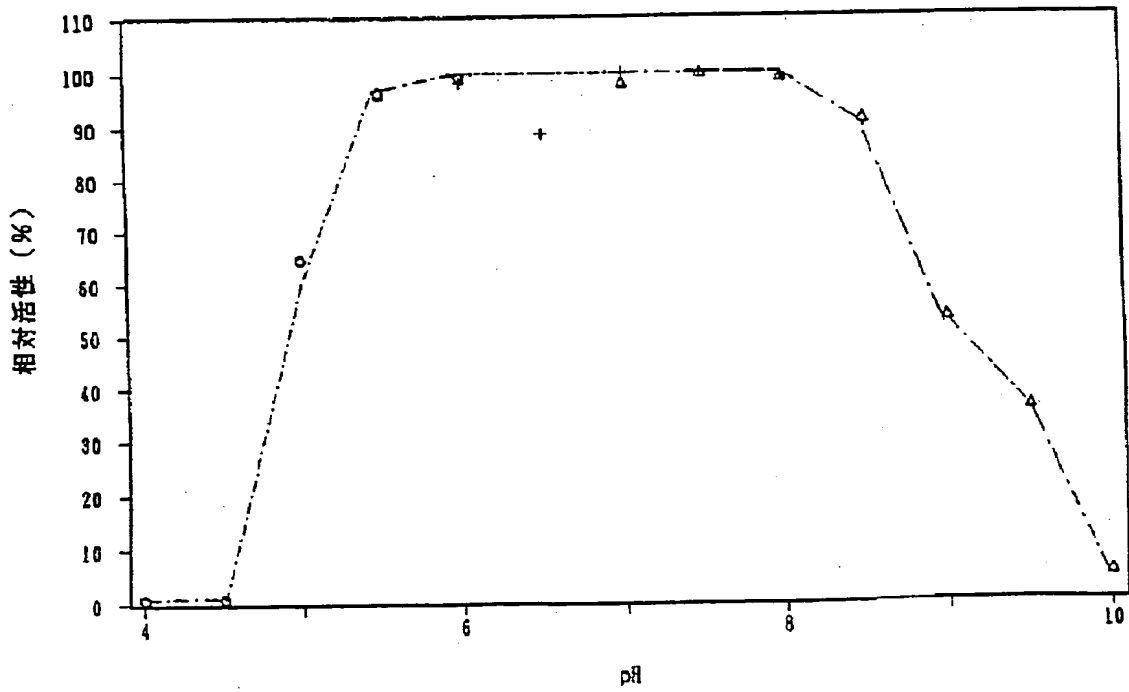
【図5】 本発明の酵素の濃度と吸光度の関係を示すグラフ。

30 【図6】 本発明による測定結果と化学的測定法による測定結果の相関を示すグラフ。

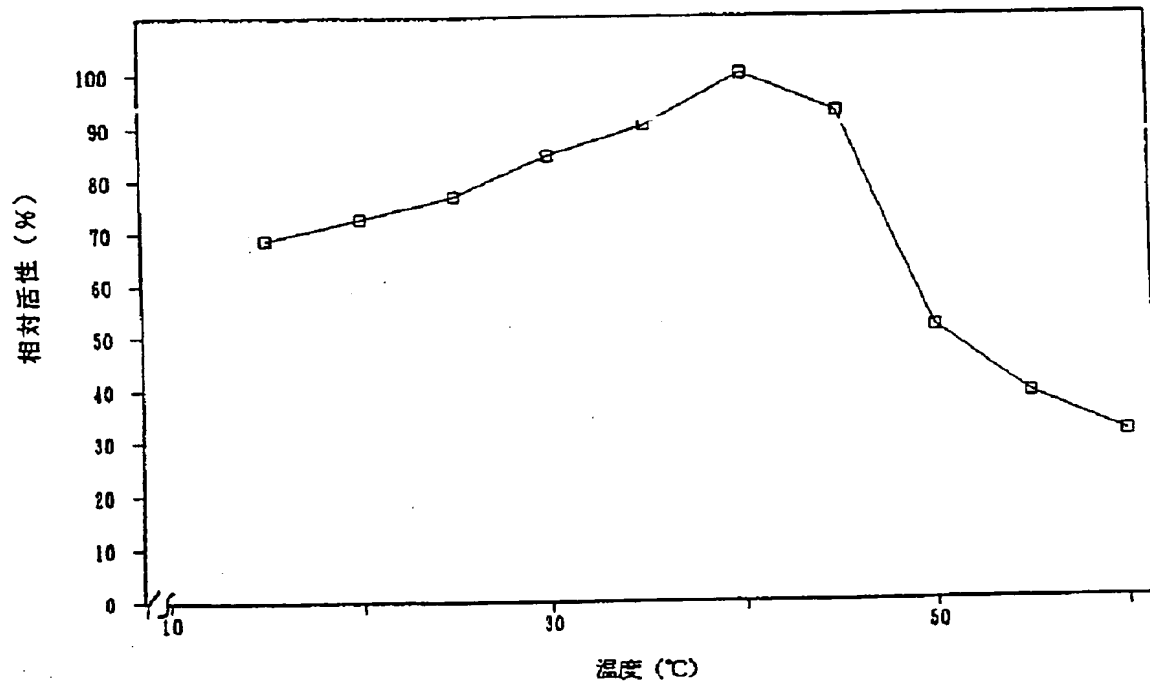
【図1】



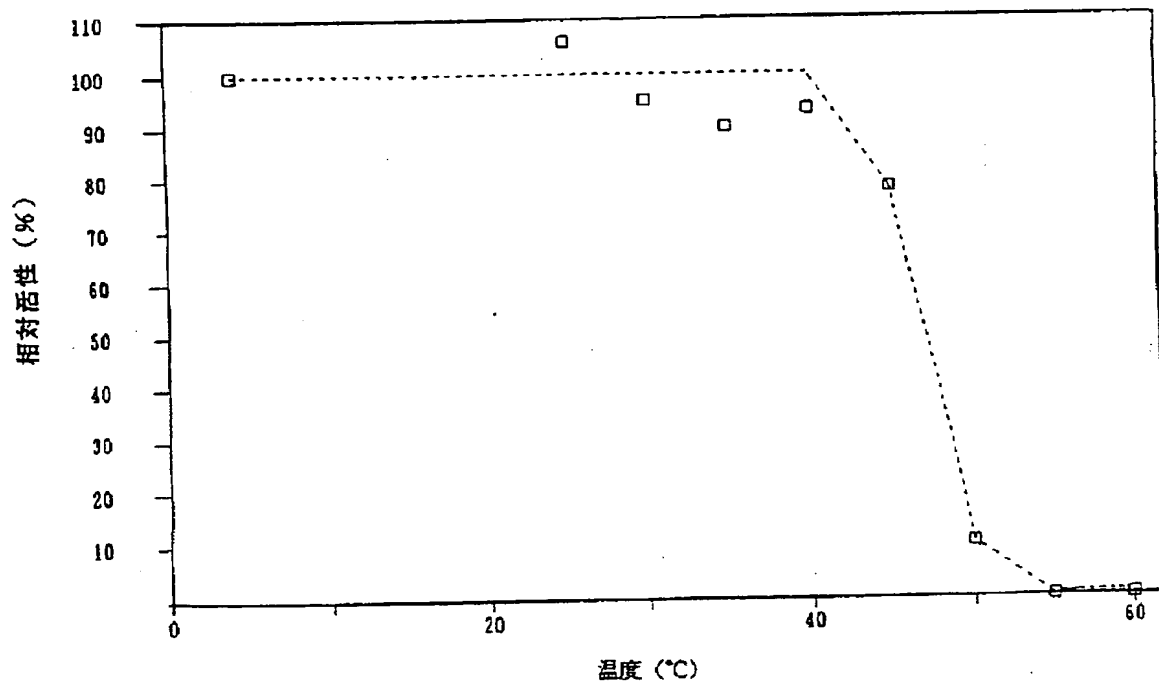
【図2】



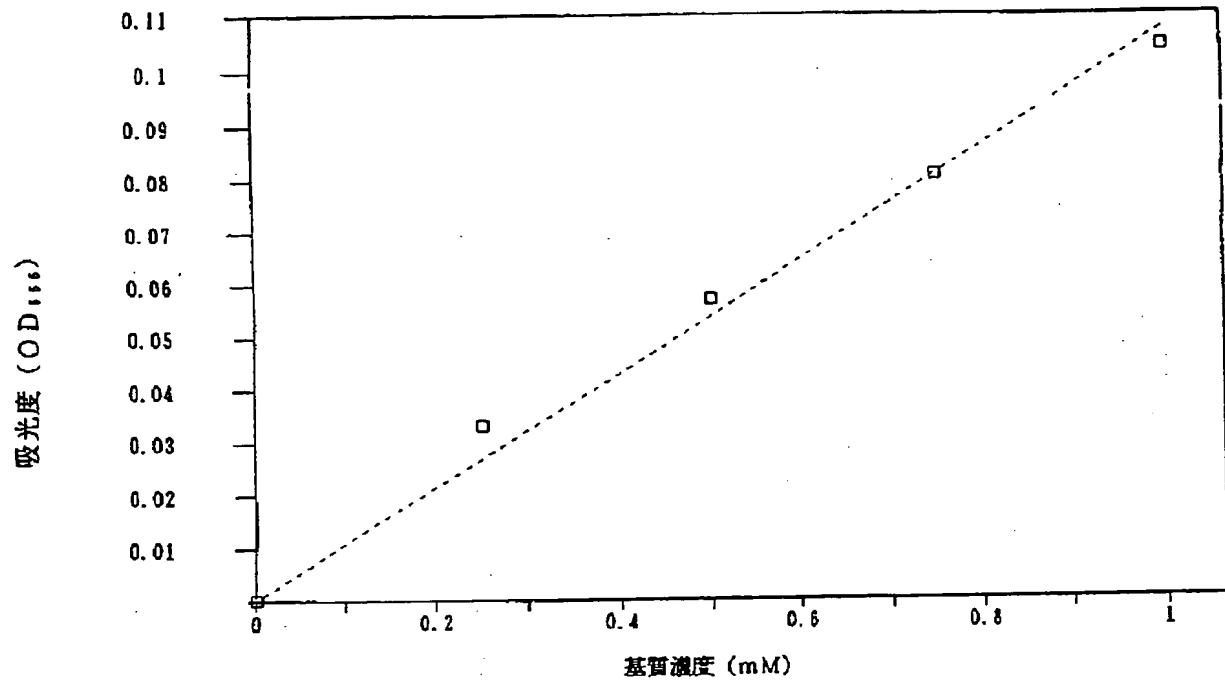
【図3】



【図4】



【図5】



【図6】

